

## Novel antibodies and methods for their use.

Publication number: JP6506827 (T)

Publication date: 1994-08-04

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- international: A61K39/395; A61K47/48; C07K16/46; C12M1/34; C12N5/10; C12N15/02; C12P21/08; G01N33/536; G01N33/542; G01N33/543; C12R1/91; A61K39/395; A61K47/48; C07K16/46; C12M1/34; C12N5/10; C12N15/02; C12P21/08; G01N33/536; G01N33/543; (IPC1-7): C12P21/08; A61K39/395; A61K47/48; C12M1/34; C12N5/20; C12N15/06; G01N33/536; C12N5/20; C12R1/91

- European: A61K47/48T4B46D; C07K16/46D; G01N33/542; G01N33/543B

Application number: JP19920508633T 19920424

Priority number(s): GB19910008954 19910426; GB19920007192 19920401; WO1992GB00769 19920424

Also published as:

JP3431140 (B2)

EP0511011 (A1)

EP0511011 (B1)

US5573920 (A)

NZ242510 (A)

more >>

Abstract not available for JP 6506827 (T)

Abstract of corresponding document: EP 0511011 (A1)

This invention relates to antibodies and is particularly, though not exclusively, concerned with diagnostic and therapeutic methods using monoclonal, bi- or tri-specific antibodies. The invention also provides a method in which binding of a first antigen to a first antibody antigen binding site cause release of a second antigen from an adjacent second antibody antigen binding site.

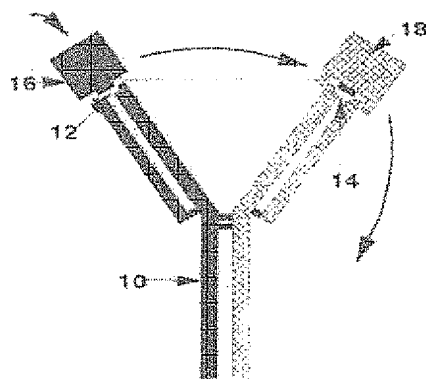


Figure 1

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-506827

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)8月4日

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	識別符号	庁内整理番号	F I
C 1 2 P 21/08		8214-4B	
A 6 1 K 39/395	M	9284-4C	
47/48	Z	7433-4C	
		8412-4B	C 1 2 N 5/ 00
		9050-4B	15/ 00
			B
			C
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 10 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平4-506833  
 (86) (22) 出願日 平成4年(1992)4月24日  
 (85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)10月26日  
 (86) 国際出願番号 P C T / G B 9 2 / 0 0 7 6 9  
 (87) 国際公開番号 W O 9 2 / 1 9 9 7 3  
 (87) 国際公開日 平成4年(1992)11月12日  
 (31) 優先権主張番号 9 1 0 8 9 5 4 . 0  
 (32) 優先日 1991年4月26日  
 (33) 優先権主張国 イギリス (G B)  
 (31) 優先権主張番号 9 2 0 7 1 9 2 . 7  
 (32) 優先日 1992年4月1日  
 (33) 優先権主張国 イギリス (G B)

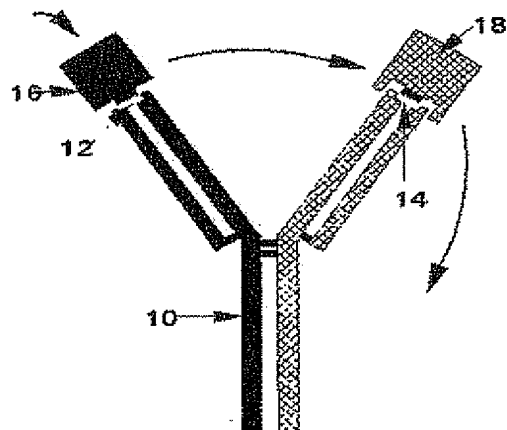
(71) 出願人 サーフィス・アクティブ・リミテッド  
 イギリス国、エイボン、プリストル、ハー  
 ベリー・ロード、ヘンリーズ・ハウス、ホ  
 ウトン・ストーン (番地なし)  
 (72) 発明者 ランドル、ベヴァリー・ジェーン  
 イギリス国、ビーエス8・2 エックスエ  
 ル、エイボン、プリストル、アッパー・ベ  
 ルグレイブ・ロード 19  
 (74) 代理人 弁理士 曾我 道照 (外6名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体およびその使用方法

(57) 【要約】

本発明は抗体に関するものであり、かつ詳細には、これに制限されるものではないが、モノクローナル抗体、2 特異的抗体または 8 特異的抗体を使用した診断用および治療用の方法に関する。また、本発明は、第 1 の抗原の第一抗体抗原結合部位への結合が隣接する第二抗体抗原結合部位からの第 2 の抗原の放出を引き起こす方法も提供する。



- 2 -

## 明 細 書

## 抗体およびその使用方法

本発明は抗体に関するものであり、かつ詳細には、これに制限されるものではないが、モノクローナル抗体、あるいは2特異的 (bicoecific) または3特異的 (tricoecific) 等の多特異的 (poly-specific) 抗体を使用した診断用および治療用の方法に関する。

モノクローナル抗体に基づく抗体検査は、一般時には研究室において調製された抗体により実施されなければならないため、その検査能力も完全には発揮していない。比較的簡単な検査でさえ、洗浄工程と作製による数多い試薬の添加を必要とする。広い分野に適用し得る1工程のシステムが必要とされている。

モノクローナル抗体はまた、疾患の治療においても用途が見いだされている。例えば、体内の癌腫を破壊および治療するために、抗体蛋白質に結合された、リンシトおよび放射能性標識を含む、毒性物質で標識を破壊するモノクローナル抗体複合体が使用されている。

モノクローナル抗体技術により2特異的抗体が開発されつつあり、2特異的免疫グロブリンGの例では、各々の2特異的抗体が特異性の異なる2つの抗原結合部位を有している。2特異的抗体は、それぞれ目的物 (antigen) 抗原に結合するモノクローナル抗体を結合する2つの異なるハイブリドーマを融合して、(後に「ポリドーマ (polydome)」と称される) 1つの標識ハイブリドーマまたは「ジョーザ (Jossa)」を形成することにより製造され得る (Songcrissian, S and Songcrissian F.J. (1980) Clin Exp Immunol 22, 815 and Suresh Babu et al (1985) Proc. Natl Acad Sci USA 82, 7989 and G.B.10921A)。種ハイブリドーマは抗体結合部位または抗原結合部位の異なる2つの細胞の融合により取り除くことができる (De Lau S.H. et al (1985) J. Immunol Methods 127, 1)。最初に製造された2特異

的抗体は癌腫の免疫検査に用いられた (Hilstein C. and Cuellar A.C. (1983) Nature 305 587)。この抗体は、モノクローナル抗体を分泌する細胞と免疫マウスからの脾細胞とを融合することにより製造された。第一結合部位は癌腫細胞に特異的であった。腫瘍の結合部位である第二結合部位はマーカー酵素に特異的であった。癌腫に特異的な免疫反応は、癌腫細胞、癌腫に対するノイズの減少、染色処理の簡便化、および癌腫細胞の保存を増加させた。

2特異的抗体は、抗体との結合を維持する、腫瘍に対する効果的マシンの作用とする (Corvella J.F. et al (1987) Cancer Immunol Immunother 29 383)。あるいは細胞毒性マーカー細胞上の細胞抗原と細胞毒性を交叉連鎖させる (Nitta J. et al (1980) Lancet 825 888 and Fanger W. and Guyre R. Wilbeck S. 878-880 (1981)) 等の新規な治療方式において広範な用途が見いだされている。2特異的または3特異的抗体の、化学的リンカー等のその他の製造法、後者の論文において説明されている。

WO 91/07721 4 明細書は、ある酵素が2特異的抗体と結合することにより、酵素活性に対して安定化される免疫複合体を形成している。

WO 91/08131 4 明細書は、不活性化抗腫瘍抗体とその活性な形態に変換する酵素とヒト癌細胞の双方と結合し得る2特異的抗体を開示している。この抗体と酵素とを含む免疫複合体は、不活性化抗腫瘍抗体と癌細胞との結合を促進し、癌細胞の細胞死を誘発する。また、ポリドーマの製造方法も開示されている。

本発明の目的の1つは、従来の免疫検査よりも反応工程数の少ない、簡便かつ1工程のみを含む免疫検査法を提供することである。

本発明の1つの態様によれば、ある抗原が1つの抗体抗原結合部位に結合することが、開示する第二抗体抗原結合部位からの別の抗原の放出を引き起こす方法が提供される。細胞による標識物を放出するものではないが、所定の抗原と結合して抗原との間の抗体結合が、結合している抗原の第二抗体抗原結合部位からの放出を引き起こすのであると本発明者は確信している。第一および第二抗体抗原結合部位は、同一の多特異的 (multispecific) 抗体または物理的に隣接する別の抗体により提供されることができ、"多特異的" という用語は、2特異的

および3特異的抗体等の、1つより多い抗原結合部位を有する抗体全てを含む。第一結合部位の分子の結合を介する第二結合部位からの結合分子の放出は、抗体抗原結合部位 (antibody-mediated signal transduction) と呼称することができ、本文中で用いられる "抗体" という用語は、Ig G、Ig A、Ig M、Ig D および Ig E 等の免疫グロブリン、ならびに自然に生じる抗体または抗原結合 D N A 複合体またはその他の種類の分子全てにより製造される抗体の抗原結合部位を有する他の要素を含む。

本発明者は、非常に高い濃度、免疫学的濃度 (典型的には  $1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ ) であるのに対し、例えば  $10 \sim 100 \mu\text{g/ml}$  よりも高い濃度でマイクロタイタープレート (microtitre tray) 上に抗体がコーティングされると、ある抗体抗原結合部位が標識する第二抗体抗原結合部位に結合した他の抗原の放出を引き起こし得るほど隣接する抗原結合部位が非常に近接して配置されるといって、驚くべき発見を得た。驚ましい発見感において、免疫反応は、約  $20 \mu\text{g/ml}$ 、若しくは約  $50 \mu\text{g/ml}$  よりも高い濃度で免疫反応で抗体を結合させることを含む。

第2の抗原は第二抗体抗原結合部位に不活性化状態で結合され、そして第1の抗原が第一抗体抗原結合部位に結合する際に活性な形態で放出されることができ、第2の抗原は、標識またはその他の治療用作用薬、腫瘍または他の放出可能なマーカー、あるいは化癌剤等であることができる。この酵素は、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼまたはウレアーゼであることができる。

モノクローナル抗体は癌腫治療の作用をブロックすると報告されている。例えば、抗体 (Ab) は強い抗癌剤であるマイトザントロン (mitozantron) の細胞毒性を抑制する (Flavell S.B. Flavell O.J. (1990) Br. J. Haematol. 75, 830-3)。本発明による、薬剤に方向付けられた結合部位を1つ備え、その薬剤を不活性化にする2特異的抗体は、この2特異的抗体の第二抗体抗原結合部位が方向付けられている分子の免疫反応において活性な薬剤を放出する。

第二抗体結合部位からの抗原の放出は、表出された抗原、例えば、腫瘍または癌の細胞分子、あるいは存在するならばその抗原産物の1つ、例えば、放出された抗原により誘発された癌腫の免疫反応物の、腫瘍する抗体上の第三結合部位における結合を誘発することであり、それにより、隣接する第四抗体結合部位からの第三の結合抗原の放出を引き起こすことができる。

本発明の多特異的抗体は、第2の "治療" 薬を特異的抗体における治療作用部位の放出を誘発することができ、それは、腫瘍細胞インジケータの第1の抗体の第一結合部位への結合が、その抗体の第二結合部位にすでに結合していた酵素の放出をもたらし、この放出された酵素またはその反応産物の1つが第2の抗体に結合し、そして次に、この二番目の結合部位 (event) が第2の抗体に結合している治療作用部位の放出を引き起こす。カスケード作用による、酵素の反応生成物の結合は、切開結合信号の増幅を生むので、驚ましいことである。やはりカスケード作用により作用する診断/治療用の2特異的抗体では、第一抗体結合部位が診断用マーカーに方向付けられ、第二抗体がインジケータ酵素に方向付けられ、そして第三抗体結合部位が不活性化状態で治療作用部位を有することができ、抗体をその用途に適するように配することは可能であることは理解されよう。例えば、10の異なる反応工程を特徴とする Ig M 抗体が使用される。

驚ましい発見感においては、ある抗原結合部位が、癌腫細胞の活性部位または細胞膜作用部位の作用として本質的な分子成分のインジケータ/標識の活性部位あるいはその近傍における分子結合により、不活性化状態で診断用または治療用の作用薬を保持する。治療法において、第二抗体結合部位は、疾患または癌の発生を示すマーカー等の放出対象分子に対して方向付けられる。このマーカーの存在下、不活性化状態で保持された作用薬が、2つの異なる抗体抗原結合部位の非特異的な結合による抗体結合の結果として、活性な形態で放出される。治療法においては、結合された不活性化作用薬が、前記の放出対象分子または他の抗原、あるいは他の抗原の存在により放出されることができ、

本発明の抗体の診断目的の使用は、さらに以下のことを含む。水、塩水の吸引液、消化管の吸引液、血漿、組織液等の S P - A の測定。S P - A の不活性化または低いレベルがリスクを示す、呼吸器系疾患 (R D S) のリスクの診断。

R D S 患者および成人 R D S の成人患者における呼吸器の疾患の診断。S P - A の増加したレベルが正常な状態を示す。

人工透析患者の腎臓治療の監視の監視。腎臓の状態の監視は S P - A の状況により時間付けられる。

異なる抗体からの2つの異なる結合分子の放出は、双方の放出分子が存在するときのみ起こる反応を要することができ、抗原生成後、抗原の放出を誘発する別の抗体を結合させることができる。該抗原とは、例えば、その抗体に結合した治療用または診断用分子等である。治療用抗体において、両方の抗原前駆体が存在するときに活性薬剤形態をとり、そのときにその治療のために活性となる2つの抗原前駆体が放出されることができ、例えば腫瘍の治療において、第1の2特異的抗体は、多くの腫瘍腫瘍のインジケータである即発腫瘍抗原アブタン (S-P-A) に対して方向付けられた第一抗原結合部位、および腫瘍前駆体Aに対して方向付けられた第二抗原結合部位を有する。第2の2特異的抗体は、急速な腫瘍生長のインジケータであるトランスフェリン受容体に對して方向付けられた第一抗原結合部位、および腫瘍前駆体B、即ち腫瘍前駆体Bに対して方向付けられた第二結合部位を有しているが、腫瘍前駆体Aとは結合して活性な抗原複合体となる。結合された両前駆体AとBを有する2つの抗体を含む複合体を腫瘍患者の治療に使用すれば、S-P-Aとトランスフェリン受容体の存在下で腫瘍前駆体AとBを放出して活性な抗原複合体を形成させることが可能であろう。診断用途においては、2つの異なる診断用抗原の前駆体カスケード腫瘍反応を誘発し、双方の診断用エピソードが検出されると、検出可能な診断用インジケータ産物だけが生成される。例えば、インヒビンの濃度をそれぞれに特異的な第一抗原結合部位、およびホースラディッシュペルオキシダーゼとグルコースオキシダーゼそれぞれに特異的な第二結合部位を有する2つの特異的抗体が使用されることである。インヒビンの濃度と比例する形でグルコースオキシダーゼにより生成されて過酸化水素を生成し、次にこの過酸化水素は、オルトフェニレンジアミンの容易に検出可能な高濃度増強と同時に、ペルオキシダーゼにより増強される。検出結果が得られる前に2つの異なる抗原部位が検出されればならぬ従来の抗原検出装置と異なり、検出結果が得られる。

第一および第二抗原結合部位は、(i) 免疫反応において容易に抗原をコーティングするための、特に20 ng/ml、若しくは50 ng/mlを超えて高濃度の2種類のモノクローナル抗体の混合物、(ii) 2特異的抗体に結合して、モノクローナル抗体を送送するビューゾーマ、および(iii) 異なる抗原に対する結合部位を有し、相関に誘導されるか、または化学的修飾により生成された2特異的抗体

により、提供され得る。前記事象(i)は細胞内形質導入であると考えられ、同時に前記(ii)は細胞内形質導入であると考えられる。前記事象(iii)は細胞間および細胞内の形質導入を含んでいる。

おぼろげのモノクローナル抗体は、2種類の平均存在するモノクローナル抗体の混合物、または単一特異的抗体の確率的な混合物、例えば、種別Aまたは種別Bを用いたアフィニティクロマトグラフィーあるいはイオン交換またはゲル浸透による分画された免疫グロブリンを分離するための処理により、任意的に生成され得る。

モノクローナル抗体の製造には、均質に精製された2特異的または3特異的免疫グロブリンを必要とする。均質とするための精製は、それぞれの抗原部位がそれに対して方向付けられた機知性マトリックスを用いた、シーケンシャルアフィニティクロマトグラフィー工程により達成されることができ、従って、多特異的抗体は、不純化した後、治療用または診断用分子を使用したクロマトグラフィーまたはイオン交換により精製される。

要する限の異なるアフィニティクロマトグラフィーは、均質にする前の精製中に不純化抗体が多特異的抗体のイデオタイプ抗原決定基を保持する、不純化した抗イデオタイプ抗体マトリックスを使用することで達成される。

本発明の他の特徴によれば、診断における抗原の存在または不在を決定するための免疫検定方法が提供されるが、その方法は、抗原および抗体に対する結合部位を有し、抗原の抗体への結合が抗原を不活性にする多特異的抗体と抗体とを接触させ、その際前記抗原の抗体への結合が結合していた前記抗原の活性な形態での抗体からの放出をもたらすこと、ならびに試料中の抗体の存在を示す放出された活性抗原の量を測定することを含む。従って、本発明のこの特徴は、抗原と抗体を含む簡単な免疫検定方法を提供する。

結論による裏付けを望むものではないが、本発明者は、新たに結合した抗原と結合していた抗体との間の立体的障害が、抗体からの抗原の放出を引き起こすと信じている。従って、腫瘍は、目的の抗体と抗原の立体的障害を助長するように、非自然的にはそのサイズに差をつけて選択される。使用される抗体は、完全に抗原に結合して、腫瘍が抗原の存在下で結合を解くことがないようにするべきである。腫瘍は、その活性部位で抗体と結合することができない。

例えば、その欠陥が早期の末期児に起こる呼吸器腫瘍のリスクのインジケータとなるS-P-A [Nathan et al. (1988) *Am J Obs Gynecol* 158: 1553] が既述であってよい。この呼吸器腫瘍は全期生児の2%を占め、そして生後1週間以内の呼吸器腫瘍の死の最も一般的な原因である。

腫瘍は、例えば、全ての腫瘍が完全に無効化され、かつ容易に検出可能な段階である、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、炭酸脱水酵素またはホースラディッシュペルオキシダーゼであることができる。

本発明の他の特徴によれば、腫瘍が抗体への結合により不活性となり、そして抗原の抗体への結合の際に活性な形態で腫瘍から放出される。前記と腫瘍に対する結合部位を有する多特異的抗体が提供される。この抗体は2特異的抗体であることが好ましい。

本発明の他の特徴によれば、S-P-Aおよび腫瘍に対する結合部位を有し、腫瘍の抗体への結合は腫瘍を不活性にする多特異的抗体と抗体とを接触させ、その結果S-P-Aの抗体への結合が結合していた抗原の活性な形態での抗体からの放出をもたらすこと、ならびに試料中のS-P-Aの存在を示す放出された活性抗原の量を検出することを含む。哺乳動物腫瘍検出中のS-P-Aの検出方法が提供される。この特徴は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼであることができる。

本発明の他の特徴によれば、抗体および第1の腫瘍に対する結合部位を有し、第1の腫瘍の抗原生成物が試料中の抗原の存在を示す容易に検出可能な反応性腫瘍素(第2の抗体)と第2の腫瘍の第2の抗原の高濃度として作用する。第1の2特異的抗体に結合して抗原を放出させることを含む、試料中の抗原の存在または不活性を測定するための免疫検定方法が提供される。前記第1の腫瘍はグルコースオキシダーゼであることができる。また、前記第2の腫瘍はホースラディッシュペルオキシダーゼであることができる。

本発明による診断方法は、多特異的抗体がバイオセンサの生物学的要素(enzymatic element)として働くバイオセンサにおいて実施されるために好まれていることができる。現在までに、モノクローナル抗体を電気バイオセンサに用いて、ヒトガラクトトリン [Robinson et al. et al. (1987) *Biosensors* 2: 147] および食品中のスタフィロコッカス・アウレウス [Staphylococcus aureus] [Michalski et al. et al. (1990) *J. Appl. Bacteriol* 68: 977] が検

出されている。しかし、検出用抗体は抗体抗体抗原の免疫反応によって阻害されずにいることがないことおよび腫瘍の発生にも問題があることから、一般的に適用は不可能であると証明されている。本発明の方法は、免疫酵素 (integral enzyme) を使用するもので、2特異的抗体は電極および平準化電極に直接組み込まれることができる。例えば、炭素電極またはイオン交換性電極効果トランジスタ (ISFET) はグルコースオキシダーゼと結合した2特異的抗体を含むことができる。あるいは、炭素電極または化学的修飾電極効果トランジスタ (CMFET) はウレアーゼと結合した2特異的抗体を含むことができる。

腫瘍および本発明の方法に用いられる多特異的抗体の調製の例を下記に記述するが、これらは単に例示のためのものにすぎない。 $\alpha$ -ガラクトシダーゼは充分に活性付けられており、そしてその活性は容易に検出される。

グルコースオキシダーゼはアスパーギルス・ニゲル (*Aspergillus niger*) から容易に分離され、186 kDの分子量を有する。グルコースオキシダーゼはマンノースを基質に含む糖基質であるので、糖基質を保持したままマンノースの糖基質を用いて改変反応させて、結合不活性な糖基質の糖基質を増加させることができる [Kosovic B. et al. (1987) *Appl Biochem Biotechnol* 15: 205]。グルコースオキシダーゼ基質体のサイズは化学修飾により調節することができる。グルコースオキシダーゼは、炭素電極の調製成分として増強される。

チナクマメから容易に分離され得るウレアーゼは、分子量59 kDの6量体 (hexameric) 構造であり、96 kDのサブユニット各々1つの活性部位を備えている。ウレアーゼは炭素電極における調製成分として使用される。

炭酸脱水酵素は、29 kDの比較的低い分子量を有する単量体酵素である。炭酸脱水酵素は二酸化炭素の水和および炭酸水素塩からの脱水を触媒し、そしてヒト赤血球から容易に分離され得る。

ホースラディッシュペルオキシダーゼは充分に活性付けられたヘム部位を有する [Khar et al. et al. (1980) *J Biol Chem* 255: 6860]。ホースラディッシュペルオキシダーゼは、グルコースオキシダーゼにより生成されてホースラディッシュペルオキシダーゼの基質として使用する過酸化水素による酵素カスケードを生じさせるために、グルコースオキシダーゼを第一部位に、かつホースラディッシュ



第一組：抗原反応性または抗原反応性でありチオグアニンに耐性なHAT選択性ハイブリドーマと、抗原反応性または抗原反応性の免疫マウスの脾臓細胞との融合、および融合細胞のHAT選択性。

第二組：抗原反応性または抗原反応性のどちらか一方であるチオグアニン耐性ハイブリドーマと、該ハイブリドーマが抗原反応性であるときには抗原反応性でありその他の場合には抗原反応性であるウアバイン耐性ハイブリドーマとの融合、および融合細胞のウアバイン-チオグアニン培地による選抜。

第三組：抗原反応性または抗原反応性のどちらか一方であるチオグアニン/ウアバイン2重耐性ハイブリドーマと、該ハイブリドーマが抗原反応性であるときには抗原反応性でありその他の場合には抗原反応性である野生型ハイブリドーマとの融合および融合細胞のHAT-ウアバイン培地中の選抜。

細胞融合は標準的な技術により実施する。チオグアニン耐性ハイブリドーマを免疫マウス由来脾臓細胞とそれぞれ1:10の細胞比率で混合し（第一組）、そして血清含有培養液中で5日（w/v）ポリエチレングリコール1500の存在下に2週間インキュベートすることによりヒューザーマを調製する。細胞融合要素も、血清含有培養地の一定時間後の添加により終了させる。次に、ヒューザーマをマルチウエル培養液に800以上の割合の培養として植え、そして2週間経ってHAT下選抜培地中で培養する。

異なる選抜可能なマーカーを備える2種類の予め存在するハイブリドーマの組合せによりヒューザーマを生成するとき（第二組）には、融合に先立ち1:1の比率で細胞融合を混合する。融合要素は血清含有培養液中で5日（w/v）ポリエチレングリコール1500の存在下に7日間培養する。この反応は、一定の速度で5分間おける血清含有培地の添加により終了させる。得られたヒューザーマは、マルチウエル培養液内で200の割合の培養として、5 w/v チオグアニンと0.3 mM ウアバインを含有する選抜培地中に植える。37°Cにて5% (v/v) CO<sub>2</sub> 空気中で2週間インキュベートした後に、培養を調査する。

2重耐性耐性ハイブリドーマと野生型ハイブリドーマとの組合せによりヒューザーマを生成するとき（第三組）には、融合に先立ち1:1の比率で細胞融合を混合する。融合要素は、血清含有培地中で5日（w/v）ポリエチレングリコール1500の存在下に7日間培養する。この反応は、一定の速度で5分間おける

異なる培地含有培地の添加により終了させる。ヒューザーマは、マルチウエル培養液内で200の割合の培養として、0.5 mM ウアバインを含有するHAT選抜培地中に植える。

次に培養物を前記群またはメトリセートの培養でスクリーニングする。そして、反応性培養物を抽出された抗原の試験に同様に試験する。培養物を、解凍融合免疫吸着性凝集（ELISA）により、選択された抗原と反応する抗体の存在でスクリーニングする。ウエル当たり50μlの0.1M 炭酸緩衝液（pH 9.5）中に置いて4°Cで一晩インキュベートすることにより、5-10 μl/mlの濃度で96-ウエル培養板上に抗原を不動態化する。10% (v/v) ウェスタン血液を各ウエルに添加する（pH 9.5）をウエル当たり100μl 加えて、室温で2時間経って培養物をブロックした。試験される培養上清を、ウエル当たり50μl で置換して試験に供し、そして室温で1時間インキュベートする。この培養液を0.5% (v/v) ツイン20を含むPBSで洗浄し、次いで、第二層抗体に結合した抗マウス免疫グロブリン抗体を用いて、酵素免疫反応の連続的な検出により結合抗体を検出する。次いで、2種類の抗体を連続すると両方された培養物を固定化および単相単位の標準的な技術によりクロン化して、ネグティブ選択の量の分泌免疫グロブリンを生成するために培養する。そして分泌された抗体を、イオン交換クロマトグラフィーにより精製し（Kong JT and Colville RP (1987) J. Immunol. 139, 1300）、実験的な診断に使用するために精製する。本発明においては、免疫グロブリンの精製のためにアフィニティクロマトグラフィーを用いた。

#### 抗体の生産

ヒューザーマにより分泌される2種類の免疫グロブリンまたは連続免疫グロブリンを、ELISAコーティング板中でインキュベートしてマルチウエル培地上に不動態化する。培養液は、10% (v/v) PBSを含むPBSでブロックする。次に、前記抗体と酵素含有培地中でインキュベートすることにより酵素と結合させる。未結合酵素は洗浄により除去し、そして酵素酵素複合体は使用可能となる。

前記融合は抗体を生成するために2つの異なる方法で実施する。第一組の方法では、抗原を15分間かけて添加し、その上清を取り出し、そして次にこの上清を決定して前記融合体から分泌される酵素活性の存在を調べる。第二組の方法では、同時に実行される1工程方式において、酵素活性を抗原と同時に前記融合体に添加する。同様の融合において、試験中の抗原の存在を示す基質濃度により色の変化により、酵素活性を直接に測定する。

例えば、前記抗原結合の方向により精製された抗原結合性抗体が蛋白A [Katzyl SL and Sipek C (1979) Lab Invest 40:582] を用いて、特定の抗原性を引き、そして、未結合部分から抗原結合部分の蛋白Aを除去して決定する。

#### 選別培養等能質導入を促進する2種類の抗体

ヒューザーマの細胞系GAL 30.19は、SP-Aと（大腸菌：Escherichia coli 由来の）β-ガラクトシダーゼとに反応する2種類の免疫グロブリンを分泌する。この細胞系は、6-チオグアニン耐性04ハイブリドーマ [Randle et al (1992 特許中)] のサブクローンでありSP-Aと反応する抗体を分泌する04.1.13と、ミョウバ細胞に由来する細胞系に由来する抗原結合能力のβ-ガラクトシダーゼ [Sipek C (1979)] での選別に基き1週間培養されたB10/ヒマウス由来の脾臓細胞との細胞融合要素から分泌された細胞系である。細胞融合要素に先立ち200μgのβ-ガラクトシダーゼを前記マウスの脾臓内に4日間注入した。

細胞融合は標準的な技術により実施し、そして得られた細胞融合系HAT下選抜培地中に植える。培養物を17日後にスクリーニングした。7.14のヒューザーマ培養が得られ、その内の41がβ-ガラクトシダーゼと反応する抗体を分泌することが間接ELISAにより判明した。ウェスタン免疫ブロットにより選別したところ、8培養物がSP-Aとβ-ガラクトシダーゼの両方と反応する免疫グロブリンを分泌した。これらの培養物は、限定希釈によりクロン化し、そしてさらに研究のために6クロンの培養を選択した。これらの6クロンの細胞系は1つがGAL 30.19である。GAL 30.19の試験はグズバスター法の免疫検出に供し、1992年4月22日付で発覚番号：22942211として欧州

動物細胞培養コレクション [the European Collection of Animal Cell Culture, Fortoo, Dover United Kingdom] に登録されている。

この細胞系は、アルファHAT培地中で培養の方法にて培養され、選択しない培養要素を培養において、1ml当たり100μgの免疫グロブリンを分泌する。

濃縮GAL 30.19免疫グロブリンを免疫Aセファロース (Sigma P8881) を用いた標準的アフィニティクロマトグラフィー技術により分離した。最初に洗脱された、培養物上清 1.2 ml を1M トリス塩酸 (pH 8.5) の添加によりpH 8.2に調整し、そして5mlの免疫Aセファロースカラムに送った。1M トリス塩酸 (pH 8.5) の添加にてpH 8.2に調整したPBSで10回洗脱した後、0.1M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.5) を用いて結合免疫グロブリンを溶出した。1mlの部分を1M トリス塩酸 (pH 8.5) 700μl により徐々に中和した。この溶液部分の蛋白濃度をブーマーブルー (Bioassay Blue) 色濃度を検定により測定し、かつ間接ELISAにより抗体方向を評価した。培養物 1.2 ml から6.05 μgの免疫グロブリンが分離された。最も濃縮された部分の間接ELISAによる抗体方向は、β-ガラクトシダーゼに対しては1:10<sup>4</sup>、そしてSP-Aに対しては1:10<sup>5</sup>であった。

#### β-ガラクトシダーゼおよびSP-Aの両方の抗体を分泌する細胞系

濃縮GAL 30.19を抗原選択性ELISA方式に用いて、β-ガラクトシダーゼおよびSP-Aを検出することができる。細胞に説明すれば、炭酸水素塩緩衝液 (pH 9.6) をウエル当たり50μl 加え、1ml当たり50μgの、免疫グロブリンを4°Cで一晩インキュベートして96-ウエル平板免疫吸着性板 (Falcon Cat No. 3912) にコーティングした。10% (v/v) PBSを含むPBSをウエル当たり100μl 加え、培養物を室温で2時間ブロックした。

#### β-ガラクトシダーゼ抗原標準

表 6-506827 (7)

0から100 mg/ml の増加した濃度のβ-ガラクトシダーゼを50 μl ずつ供し、同時に1時間インキュベートした。0.5% (v/v) ツイーン20を含むPBS 200 μl を用いてウェルを2回洗浄し、そして結合β-ガラクトシダーゼを酵素底物である「β-ガラクトシダーゼ基質溶液」の添加により検出した。この基質溶液は、通常に添加しながら0.1% リン酸緩衝液 (pH 7.3) 1 ml に溶解したO-ニトロフェニル β-D-ガラクトピロノシド (Sigma H-1127; ONPG) 20.5 mg を含む、ONPG溶液 33.2 μl をリン酸緩衝液 5 ml に添加したが、この溶液は、ウシ血清アルブミン (BSA) と塩化マグネシウムを下記の割合:

2.7 ml 0.1 M pH 7.5 リン酸緩衝液:  
0.5% (w/v) BSA を含む 0.1 ml 0.03 M 塩化マグネシウム、  
で希釈していた。試験槽方式において、GAL30.19は、最小限1 ml 当たり5 μg のβ-ガラクトシダーゼを抽出した。

#### SP-A 活性測定:

5~100 μg/ml の濃度のSP-Aを50 μl ずつ供し、室温で1時間インキュベートした。ウェルをツイーン20を含むPBSで2回洗浄し、そして結合したSP-Aを、PBS中の1.50 mg ビオチン化ウェル当たり30 μl の添加により検出した。E8ハイブリードマは、D4と異なり、SP-Aの第二エポトープと反応するモノクローナル抗体を分泌する [Bandt et al. 1992 参照]。E8免疫グロブリンは、免疫グロブリンまたは3 ビオチン化分子の割合で置換される [野崎 E8-ビオチン化 1 ml 当たり1 mg に希釈されていた]。30 分間のインキュベーションの後、塩基液ツイーン20を含むPBSで2回洗浄し、そして次にウェルを1分間で、PBS中の1:500 アジジン-アルカリホスファターゼ 50 μl とインキュベートした (PBS中に1 ml 当たり1 mg 野崎 E8-ビオチン化)。ウェルをツイーン20を含むPBSで3回洗浄し、そして次にアルカリホスファターゼの底物、塩基液、前パライノロフェニル ホスファートの水溶液、ニナトリウム (Sigma 194-105E) への添加により検出した。簡単に説明すれば、ウェル当たり50 μl の底物、即ち「アルカリ

ホスファターゼ底物」を1 M ジエタノールアミン緩衝液 (pH 9.6) 1 ml 当たり1 mg で添加した。アルカリホスファターゼ基質溶液は、ジエタノールアミン 97 ml、水 860 ml、塩化マグネシウム水溶液 100 mg からなる10% (v/v) ジエタノールアミン緩衝液を金でいた。1% 塩酸を底物のpHが9.6となるまで添加し、次に水を添加してその体積を1リットルとした。使用するまで4℃の暗所で貯蔵した。酵素による基質反応は、450 nmにおける光密度の測定により検出した。この読取槽方式を用いたときに、GAL30.19は最小限6.25 μg/ml のSP-Aを抽出することができた。

#### GAL30.19によるβ-ガラクトシダーゼ活性のブロック

1 μg/ml の濃度のGAL30.19免疫グロブリン 50 μl をβ-ガラクトシダーゼのpH 9.6底物 50 μl に添加して500 μg/ml の濃度とした。これにβ-ガラクトシダーゼ基質 100 μl を添加して450 nmにおける光密度で基質反応を監視した。抗体濃度の代わりにPBS 50 μl を用いた対照試験も平行して実施した。30分間後、試験試料中の酵素生成物の光密度は、抗体の存在下では0.920、そしてGAL30.19の存在下では0.597であった。このことは、GAL30.19がβ-ガラクトシダーゼの酵素活性をブロックすることを暗示している。

#### 免疫化のための2倍量のGAL30.19免疫グロブリンの精製

物質を2倍量の免疫グロブリンを、シーケンシャルアフィニティクロマトグラフィーにより精製体から分離した。遠心分離はシーケンシャルアフィニティクロマトグラフィーであった。第一親和部位を占有する免疫グロブリンを、精製SP-Aを占有するビードマトリックスを用いたアフィニティクロマトグラフィーにより分離した。溶液は順次的に1 M ジエタノールアミン (pH 11) を用いて行い、そして両分は1 M トリス塩酸 (pH 8) にて中和した。中和した両分をG25セフアデックス ( Pharmacia ) 用いてPBSに透析後交換して「脱塩」した。この段階を次に、β-ガラクトシダーゼを阻害するビードマトリックスをグルマ

トリックスが保持しているクロマトグラフィーを用いた第二のアフィニティクロマトグラフィー工程に供した。DEAE産物を精製し、物質を2倍量の底物と反応し、そして0.02% Tween 20を含むPBS中に、洗脱時まで4℃にて貯蔵した。クロマトグラフィーの完了時には、洗脱免疫グロブリン 2.7 mg から得られた免疫グロブリン 0.38 mg が得られた。最も濃縮された部分の抗体活性はβ-ガラクトシダーゼに対しては1:10<sup>4</sup>、SP-Aに対しては1:10<sup>5</sup>であった。GAL30.19の10%および1%の存在は、前記物質を底物の免疫条件下における10% (w/v) のSP-Aを電解液添加により阻害した。

#### 洗脱液介在型物質導入の明示

物質導入洗脱液は、基質アフィニティクロマトグラフィーにより分離された濃縮GAL30.19免疫グロブリンと、SP-Aセファロースおよびβ-ガラクトシダーゼセファロースによるシーケンシャルアフィニティクロマトグラフィーにより精製体から免疫化して分離した精製免疫グロブリンとの成分により明示された。

#### 実験例 1. 濃縮免疫グロブリン検定 (図 3 参照)

E11 SA コーティング底物である底物溶液 (pH 9.6) をウェル当たり50 μl 用い、濃縮1 ml 当たり50 μg で、濃縮GAL30.19免疫グロブリンを4℃にて一晩インキュベートして底物表面をコーティングした。10% (v/v) FCS を含むPBSをウェル当たり100 μl 用いて、背景値を至低で2時間ブロックした。次に、ウェルを、0.5% (w/v) ウシ血清アルブミン (Sigma A7888) を含むPBS洗浄液で1 ml 当たり20 μg のβ-ガラクトシダーゼを含む濃度 50 μl と室温で1時間インキュベートした。次いで、ウェルを0.5% (w/v) ツイーン20を含むPBS 200 μl で2回洗浄し、不飽和した免疫導入底物表面から未結合酵素を取り除いた。

次に、洗浄液を濃縮した。0.25~100 μg/ml の増加した濃度の、精製したSP-A、分子量800 kD (ダルトン) の非特異的抗原K L H およ

び分子量1000 kD の非特異的抗原I g Mであるマウス免疫グロブリンを、50 μl 容量ずつ置換してウェルに供した。15分間後にその上置みを取り出して、β-ガラクトシダーゼ基質溶液により、検査体からの酵素の放出を評価した。底物50 μl 容量をβ-ガラクトシダーゼ基質溶液 50 μl とインキュベートした。底物から生成物への反応は、解凍上置み中に放出された酵素の存在を示す450 nmにおける光密度により測定した。物質導入洗脱液からの酵素の放出は、β-ガラクトシダーゼ基質溶液、および450 nmにおける生成物光密度の測定により、前記上置み中で測定された。1200 kDダルトンの分子量を有するSP-Aの存在下でのみ酵素が放出され、類似する分子量の抗原であるK L H (800 kD) およびI g M (1000 kD) の存在下では酵素は放出されなかった。この結果は確認することができ、そして高濃度のSP-Aにおいて飽和効果が観察された。

この方式では、GAL30.19物質導入洗脱液は、最小限6.25 μg/ml のSP-Aを抽出する。

#### 実験例 2. 精製した物質免疫グロブリン検定

物質免疫グロブリンの存在下、酵素の放出が明示された (図 4 参照)。

E11 SA コーティング底物である底物溶液 (pH 9.6) をウェル当たり50 μl 用い、濃縮1 ml 当たり20 μg で、精製GAL30.19免疫グロブリンを4℃にて一晩インキュベートして底物表面をコーティングした。背景値を、10% (v/v) FCS を含むPBSをウェル当たり100 μl 用いて底物を2時間ブロックした。次に、ウェルを、0.5% (w/v) ウシ血清アルブミン (Sigma A7888) を含むPBS洗浄液で1 ml 当たり20 μg のβ-ガラクトシダーゼを含む濃度 50 μl と室温で1時間インキュベートした。そして、ウェルをツイーン20を含むPBSで2回洗浄し、未結合酵素を不飽和した物質導入底物表面から取り除いた。

次に、洗浄液を濃縮した。0.25~100 μg/ml の増加した濃度の精製したSP-AおよびSP-Aによる低分子量の非特異的抗原K L Hを50 μl 容量ずつ、置換してウェルに供した。15分間後、上置みを取り出して、β-



ガラクトシダーゼ産物により細胞融合からの細胞放出を評価した。

高濃に説明すれば、試験50μlをB-ガラクトシダーゼ産物溶液50μlとインキュベートした。産物から生成物への変換は、非肥上膜中の酵素の存在を供す。410nmにおける光学濃度により測定した。産物導入複合体から酵素が十分に放出されたのは、何れの抗原とP-Aの存在下においてのみであり、よく似た分子量の抗原無しでの存在下では十分に放出されなかった。

図3例3。後記2特異的免疫グロブリンを用いた1工程抗体媒介信号形質導入検定(図5参照)

形質導入抗体複合体を前記の如く調製し、ツイーン20を含むPBSによる2回の洗浄により培養液から非結合B-ガラクトシダーゼを洗い流した。次に、特異的抗原抗体と同時に進行される酵素放出を、下記の通り明示した。

抗原溶液1ml当たり6.25~10Gμgに希釈した。希釈した抗原の特異的抗原S-P-Aおよび抗原P-Aにより似た分子量の非特異的抗原K-LHを50μlに等量づつ調製し、B-ガラクトシダーゼ産物溶液50μlと混合した。次に、抗原とB-ガラクトシダーゼ産物の混合液100μlを、不活化した形質導入抗体複合体を含むウェルに添加した。前記複合体からのB-ガラクトシダーゼの放出による酵素活性と、酵素に作用された生成物形成により生じる色の410nmにおける光学濃度により測定した。

生成物形成は、抗原濃度(0.1)とその10分間隔(10.1)に測定した。その両方の場合において、GAL30.1により測定される特異的抗原S-P-Aの存在のみが、充分な生成物形成をもたらした。この結果は、GAL30.19の特定の免疫グロブリンに対する抗原抗体が、不活性化結合酵素の産物放出可能な適性B-ガラクトシダーゼへの信号形質導入による1工程における酵素放出をもたらしたことを明確に示している。

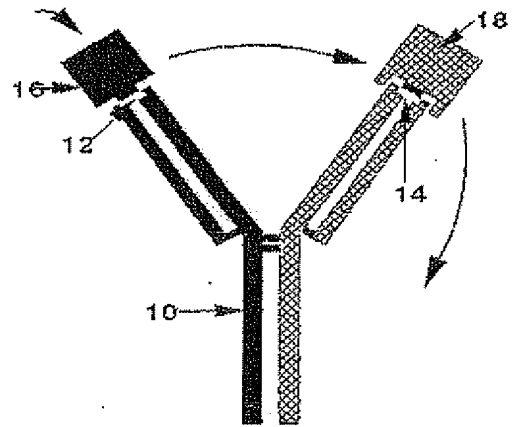


Figure 1

Figure 2

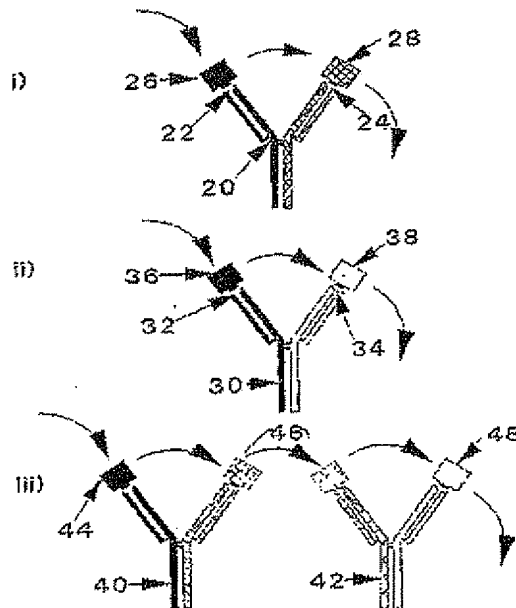


Figure 3

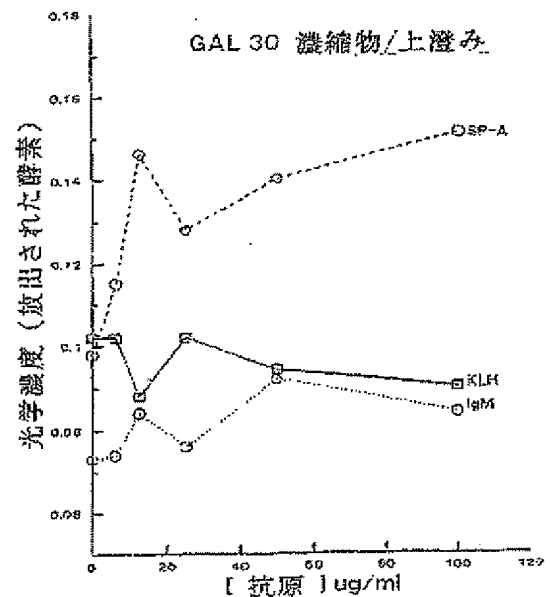
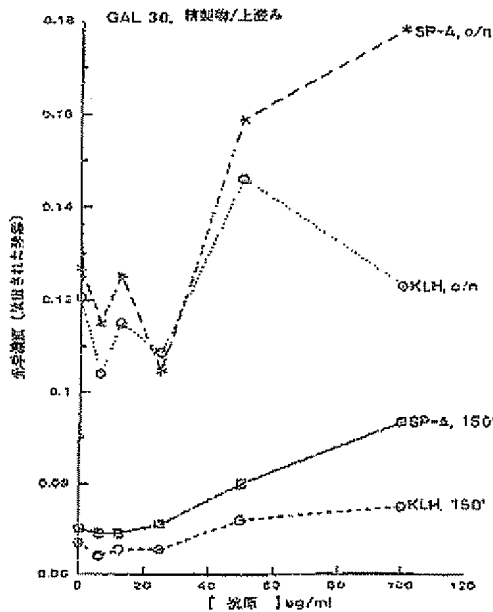


Figure 4



GAL 30, I 工程法/精製物

抗原 [ug/ml]	SP-A, 10'	SP-A, 0'	KLI4, 10'	KLI4, 0'
0	0.090	0.070	0.070	0.000
5	0.085	0.065	0.065	0.005
10	0.085	0.065	0.065	0.000
25	0.085	0.065	0.060	0.000
50	0.095	0.075	0.075	0.010
100	0.110	0.090	0.080	0.010

4CT/CS 52/00759

[illegible]

IN SMALL PRINT FORM FOR INFORMATION	ORIGINAL COPY FOR RECORD PURPOSES	EXEMPTED FROM RECORD PURPOSES
Country	Country of Issuance	Country of Issuance
A	EP. A. 0 006 463 EE. 1 DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY 21 December 1932 see the whole document	1-34
A	JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS vol. 112, 1969, NEW YORK 61 pages 1 - 61 M. B. M. DE LUU ET AL.: "Production of hybrid hybridomas based on RFL-antibody-antigen double molecules" cited in the application see the whole document	2-34
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA vol. 52, October 1955, WASHINGTON DC pages 792D - 792E. R. S. SHRESHT ET AL.: "Advantages of bi-specific hybridoma in one-step radioimmunoassay and immunography" cited in the application see the whole document	1-54
P.A.	WOL. 2 139 THE CANADIAN CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. 3 27 June 1981 cited in the application see the whole document	1-54
A	EP. A. 0 029 304 (NIDRE CORPORATION) 23 August 1983	

特異平6-506827 (10)

国際調査報告

92 9200766  
SL 58984

This report contains the results of the investigation conducted by the International Commission on the History of the Japanese Language (ICHL) in the field of the Japanese language. The information is provided for the purpose of the Japanese Language Survey (JLS) and is not to be used for any other purpose without the permission of the ICHL. The Japanese Language Survey (JLS) is a project of the ICHL, established in 1981, for the purpose of the Japanese Language Survey (JLS) and is not to be used for any other purpose without the permission of the ICHL.

Project Number (as in JLS-100)	Publication date	Survey field (number)	Publication date
W0-A-030379	27-10-83	AU-A- 559486 AU-A- 155983 CU-A- 121322 CU-A- 677794 EP-A- 0101599 EP-A- 212633 GR-A- 2158298 GR-A- 2159521 GR-A- 2159709 JP-A- 6301276	29-03-86 04-11-83 28-10-86 29-12-83 08-04-84 02-05-84 02-07-80 23-07-80 21-05-80 19-03-88
09-A-218982	23-07-86	AU-A- 559406 AU-A- 155883 CU-A- 1213290 CU-A- 677797 EP-A- 0101560 EP-A- 212651 GR-A- 2158940 GR-A- 2159293 JP-A- 6301276 W0-A- 030379	20-01-88 04-11-83 28-10-86 29-12-83 28-04-84 02-05-84 02-07-80 23-07-80 21-05-80 19-03-88
W0-A-030734	12-07-90	AU-A- 475698 EP-A- 0409013	03-08-93 03-08-93
EP-A-0301908	01-04-93	AU-A- 4402988 W0-A- 030734	18-04-90 05-04-90
EP-A-0303712	10-04-93	W0-A- 3101375 W0-A- 8124768	10-04-93 05-04-90
EP-A-000463	21-12-83	US-A- 4446233 US-A- 4279872 CA-A- 3194318 JP-A- 1888398 GR-A- 4470528	01-09-84 20-10-84 03-10-85 28-11-83 31-03-84
W0-A-0309134	27-05-81	None	
EP-A-022104	23-08-87	JP-A- 2162993	12-08-90

For more details about this report, see ICJL-100, Volume 1 of the Japanese Language Survey (JLS) and ICJL-100, Volume 2 of the Japanese Language Survey (JLS).

国際調査報告

92 9200766  
SL 58984

This report contains the results of the investigation conducted by the International Commission on the History of the Japanese Language (ICHL) in the field of the Japanese language. The information is provided for the purpose of the Japanese Language Survey (JLS) and is not to be used for any other purpose without the permission of the ICHL. The Japanese Language Survey (JLS) is a project of the ICHL, established in 1981, for the purpose of the Japanese Language Survey (JLS) and is not to be used for any other purpose without the permission of the ICHL.

Project Number (as in JLS-100)	Publication date	Survey field (number)	Publication date
EP-A-0229104	03-08-93	W0-A- 5105561	21-04-92

For more details about this report, see ICJL-100, Volume 1 of the Japanese Language Survey (JLS) and ICJL-100, Volume 2 of the Japanese Language Survey (JLS).

フロントページの続き

(5) Int. Cl.<sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号  
C12M 1/34 F 7229-4B  
C12N 5/20  
15/06  
G01N 33/536 Z 8310-2J  
/(C12N 5/20  
C12R 1/91)

FI

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG), AU, BE, BG, BR, CA, CH, CS, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, PL, RO, RU, SD, SE, US